

مقاله پژوهشی

تغییرات miR-223، miR-148a و برخی لیپوپروتئین‌های خون متعاقب تمرینات عملکردی با شدت زیاد در زنان میانسال دارای اضافه وزن یا چاق

امیر شکیب^۱، حمیدرضا زلفی^{۲*}، ژاله پاشایی^۱، لیلا مرادی^۱

۱. دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، ایران

۲. گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه فنی و حرفه ای، تهران، ایران

پذیرش: ۱۴ مرداد ۱۴۰۲

دریافت: ۵ مرداد ۱۴۰۲

چکیده

زمینه و هدف: میکروRNAها (miRNA) تک‌رشته‌ای غیرکدکننده و حاوی ۲۲-۱۹ نوکلئوتید هستند. مطالعاتی که به منظور شناسایی سازوکارهای مولکولی درگیر در ایجاد دیس لیپیدمی ناشی از چاقی انجام شده است، به نقش متناقض miRNAها در این زمینه اشاره کرده‌اند. با توجه به کمبود مطالعات در این زمینه، هدف مطالعه حاضر بررسی تغییرات miR-223، miR-148a و لیپوپروتئین‌های خون متعاقب تمرینات فانکشنال با شدت زیاد (HIFT) در زنان میانسال دارای اضافه وزن یا چاق بود.

روش کار: ۲۰ زن میانسال (۳۵-۴۰ سال) دارای اضافه وزن و چاق (شاخص توده بدنی برابر با ۲۵ تا ۳۵ کیلوگرم بر متر مربع) به صورت تصادفی و براساس درصد چربی و توان هوازی ($\dot{V}O_{2max}$) به دو گروه ۱- تمرینات HIFT ۲- گروه کنترل تقسیم شدند. نمونه‌های خونی ۴۸ ساعت قبل و بعد از هشت هفته تمرینات HIFT، به منظور بررسی شاخص‌های miR-223، miR-148a و نیمرخ‌های چربی خون از آزمودنی‌ها گرفته شد. آزمون‌های تحلیل کوواریانس (ANCOVA)، تی همبسته و آزمون تعقیبی بونفرونی به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شدند.

یافته‌ها: پس از هشت هفته تمرینات HIFT، گروه تمرینی کاهش معنی‌داری را در شاخص‌های miR-148a ($p = 0.001$)، miR-223 ($p = 0.006$)، LDL-C ($p < 0.001$)، تری گلیسرید ($p = 0.002$)، کلسترول ($p < 0.001$) و افزایش معنی‌دار HDL-C را نسبت به گروه کنترل مشاهده کردند. **نتیجه‌گیری:** احتمالاً تمرینات HIFT می‌تواند با کاهش برخی miRNAهای مرتبط با چاقی به خصوص miR-223، miR-148a باعث بهبود نیمرخ چربی خون شده و بدینوسیله با جلوگیری از بیماری‌های ناشی از دیس لیپیدمی مثل دیابت نوع ۲، بیماری قلبی عروقی باعث بهبود سلامتی شود.

واژه‌های کلیدی: تمرینات HIFT، چاقی، miR-148a، miR-223، لیپوپروتئین

مقدمه

کاهش غلظت کلسترول - لیپوپروتئین با چگالی بالا^۳ ویژگی اصلی آن است [۱، ۲]. غلظت کلسترول - لیپوپروتئین با چگالی کم^۴ می‌تواند ثابت یا اندکی افزایش یابد، اگرچه تعداد ذرات LDL^۵ می‌تواند افزایش یابد. دیس لیپیدمی، چاقی را با انواع خاصی از سرطان مرتبط می‌کند [۱، ۲]. مطالعاتی که به منظور شناسایی سازوکارهای مولکولی درگیر در ایجاد این دیس

تغذیه بیش از حد و کاهش مصرف انرژی منجر به اضافه وزن و چاقی می‌شود، شرایطی که با فرآیندهای هیپرپلازی و هایپرتروفی سلول‌های چربی همراه است [۱]. در سال‌های اخیر، شکلی از دیس لیپیدمی^۱ با عنوان "دیس لیپیدمی سوخت و سازی" شناخته شده است که ناشی از چاقی است [۱]. تحت چنین شرایطی غلظت بالای تری گلیسرید^۲ (TG) همراه با

³ High-density lipoprotein cholesterol (HDL-C)

⁴ Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C)

⁵ LDL particles (LDL-P)

¹ Dyslipidemia

² Triglycerides

لیپیدمی انجام شده است، به نقش میکروRNAها^۶ در این زمینه اشاره کرده‌اند [۳، ۴].

میکروRNAها به عنوان RNAهای تک‌رشته‌ای غیرکدکننده که حاوی ۲۲-۱۹ نوکلئوتید تعریف شده است و بیان ژن را به طور منفی در سطح پس‌رونویسی و با تخریب یا مهار ترجمه mRNA تنظیم می‌کنند [۳]. در سال‌های اخیر پژوهش‌هایی در رابطه با نقش تغییرات و تنظیمات اپی‌ژنتیک miRNAها، در سلامت انسان به‌ویژه چاقی و بیماری‌های سوخت‌وسازی انجام شده است. براساس نتایج مطالعات موجود، miRNAها در توسعه و تمایز سلول‌های چربی و سوخت‌وساز چربی، نقش تنظیمی مهمی را برعهده دارند [۳]. چندین مطالعه آزمایشگاهی مختلف، miRNAهای دخیل در تنظیم هومئوستاز کلسترول و سوخت‌ساز لیپوپروتئین‌ها را روشن کرده‌اند [۵]. این miRNAها بیان ژن‌های تنظیم‌کننده متابولیسم HDL و LDL را کنترل می‌کنند [۶]. از جمله miRNAهایی است که در سوخت و ساز چربی نقش دارد miR-148a است [۶]. این miRNA بیان گیرنده لیپوپروتئین کم چگال^۷ و پروتئین انتقال‌دهنده غشایی A1 وابسته به ATP (ABCA-1)^۸ را مهار می‌کند که یک انتقال‌دهنده‌ای است که جریان کلسترول سلولی و بیوژنز HDL را تنظیم کرده و در نتیجه باعث کاهش جریان کلسترول به HDL می‌شود [۳، ۷]. از سویی دیگر مطالعات اخیر نشان داده‌اند که تعدادی از miRNAها از جمله miR-223 بیوسنتز کلسترول را تنظیم می‌کنند [۶]. چندین مطالعه نیز گزارش داده‌اند که miR-223 مستقیماً به 3'UTR رسپتور اسکاونجر B1۹ (SR-B1) متصل می‌شود و از بیان آن جلوگیری می‌کند، همچنین نشان داده شده است مهار این miRNA پاکسازی HDL-C را افزایش می‌دهد [۶، ۷]. هر دوی miR-148a و miR-223 به‌طور هماهنگی برنامه‌های بیان ژن و سوخت‌وساز را در چندین اندام و بافت فعال متابولیکی (مثل کبد و بافت آدیپوز) تنظیم می‌کنند، بنابراین می‌تواند هدف ارزشمندی برای مدیریت دیس‌لیپیدمی و عوارض ناشی از آن باشد [۳، ۷].

ازطرفی، اصلاح سبک زندگی بر اساس فعالیت ورزشی، به‌عنوان یکی از پایه‌های اصلی درمان چاقی و کاهش خطر

بروز بیماری‌های متابولیکی است و انواع مختلفی از برنامه‌های تمرینی مسیرهای پیام‌رسانی خاصی را تغییر داده و جنبه‌های مختلف مرتبط با فعالیت ورزشی مانند سازگاری‌های متابولیکی و غیره را تحت تأثیر قرار می‌دهند [۸]. در این بین، تمرینات تناوبی با شدت بالا^{۱۰} (HIIT) که با دوره‌های فعالیت کوتاه مدت و شدید و استراحت بین آن‌ها مشخص می‌شود توجه زیادی را به خود جلب کرده است [۸]. اگرچه مطالعات روبه رشدی در رابطه با تمرینات HIIT برای بهبود سلامت و آمادگی در بزرگسالان وجود دارد، اما اطلاعات کمتری در مورد آثار این شیوه تمرینی نسبتاً جدید و تعدیل شده که به تمرین عملکردی با شدت زیاد^{۱۱} (HIFT) معروف است در دسترس می‌باشد [۸، ۹]. روش تمرینی HIFT شامل تمرینات چندوجهی و عملکردی (فانکشنال) مانند فعالیت‌های هوازی تک‌ساختاری (مانند دویدن، پاروزدن)، حرکات با استفاده از وزن بدن (مانند اسکات، هل‌دادن) و وسایل وزنه‌برداری (به عنوان مثال پرس شانه، ددلیفت) می‌باشد [۹، ۱۰]. HIFT بر حرکات عملکردی و چندمفصلی از طریق تمرینات هوازی و تقویت عضلات تأکید دارد و می‌تواند آمادگی جسمانی را در سطوح مختلف را تغییر دهد و در مقایسه با انجام تمرینات هوازی مکرر، باعث افزایش بیشتر توده عضلات می‌شود و در نتیجه استقامت، قدرت، انعطاف‌پذیری و آمادگی قلبی-عروقی را بهبود بخشیده و بر ترکیب بدن و پروفایل لیپیدی تأثیر مفیدی دارد [۸]. گزارش شده است که برنامه‌های تمرینی فانکشنال دارای حجم بالایی از تمرینات با شدت زیاد می‌باشند که طی مدت زمان خاصی تمرین با تکرار بالا انجام می‌شود [۸، ۹]. در این راستا، در مطالعه ای مشابه زلفی و همکاران (۲۰۲۲) به بررسی تأثیر تغییرات mir-204 و نیمرخ لیپیدی متعاقب هشت هفته تمرینات تناوبی با شدت بالا در مردان میانسال پیش دیابتی پرداخته و گزارش کردند که این تمرینات باعث بهبود نیمرخ لیپیدی خون می‌شود [۱۱]. همچنین کوهگردزاده و همکاران (۲۰۲۲) به بررسی تأثیر تمرین عملکردی با شدت بالا بر سطوح سرمی ApoB، I-ApoA و نیمرخ چربی در مردان و زنان سالمند پرداخته و گزارش کردند که انجام هشت هفته‌ای این تمرینات در مردان و زنان سالمند، سطوح سرمی شاخص‌های ذکر شده و عوامل مرتبط با سلامت قلبی-عروقی

⁶ MicroRNA

⁷ Low-density lipoprotein receptor (LDLR)

⁸ ATP-binding cassette transporter A1

⁹ Scavenger Receptor class B member 1

¹⁰ High intensity interval (HIT) training

¹¹ High-intensity functional training (HIFT)

پزشکی قرار گرفته و شاخص توده بدنی^{۱۲} (BMI) آزمودنی‌ها اندازه‌گیری شد. در نهایت، باتوجه به معیارهای ورود به طرح پژوهشی از بین افراد داوطلب ۲۰ نفر به‌عنوان نمونه آماری انتخاب شدند. آزمودنی‌ها یادآمد تغذیه‌ای ۲۴ ساعته و فرم رضایتنامه حضور آگاهانه در طرح، پرسشنامه فعالیت بدنی و سبک زندگی^{۱۳} (PAR-Q) و همچنین پرسشنامه سلامتی^{۱۴} PARmed-X را تکمیل کردند [۱۳]. علاوه بر آن میزان هزینه انرژی روزانه^{۱۵} (TEE) نمونه مورد مطالعه محاسبه شده و بر اساس آن، رژیم غذایی هر نفر اصلاح شد تا تنها مداخله و ایجاد کسر کالری، صرفاً مربوط به تمرینات ورزشی باشد [۱۳]. سپس آزمودنی‌ها به‌صورت تصادفی و بر اساس درصد چربی و توان هوازی ($\dot{V}O_{2max}$) (که توسط آزمون بروس^{۱۶} اندازه‌گیری شده بود) به دو گروه (۱) تمرین عملکردی با شدت بالا (HIIFT) و (۲) گروه کنترل تقسیم شدند. جلسات مرتبط با آشناسازی برنامه ورزشی یک هفته قبل از شروع طرح برگزار شد. سپس نمونه‌های خونی در دو مرحله یعنی قبل از شروع دوره تمرینات ورزشی (در حالت استراحتی) و ۴۸ پس از آخرین جلسه اخذ شدند.

پروتکل تمرینی

مطابق با دستورالعمل جهانی، پروتکل تمرینی HIIFT توسط گروه تمرین سه بار در هفته انجام شد. پروتکل تمرینی مورد استفاده در تحقیق حاضر از پروتکل تمرینی پیشنهادی اسمیت^{۱۷} و همکاران استفاده شد [۱۴]. تمرین به شکلی طراحی شده بود که شامل چهار گروه حرکات بود که طبق جزئیات توضیح داده شده در جدول ۱ انجام شد. شدت تمرینات به این صورت بود که هر ست با شدت $RPE \geq 7$ و HR فرد مطابق با دومین آستانه تهویه‌ای^{۱۸} (VT2) انجام گیرد. تعیین HR تمرین مطابق VT2 به روش پروتکل میدانی انجام گرفت. بدین منظور فرد در اجرای ۳۰ دقیقه ای تست دوچرخه بایستی یک شدت حداکثر معین یا حداکثر ضربان قلب تمرین را به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه حفظ می‌کرد. بعد از اتمام تست، میانگین

را بهبود می‌دهد [۱۲]. بااین‌حال، باتوجه به اینکه در مقایسه با حجم گسترده مطالعاتی که سازگاری‌های فیزیولوژیکی در پاسخ به تمرینات استقامتی، تمرینات مقاومتی و تمرینات HIIFT را در افراد غیرورزشکار و ورزشکار شرح داده‌اند، مطالعات بسیار اندکی وجود دارد که به بررسی اثر تمرینات HIIFT پرداخته باشند. در مجموع، با توجه به کمبود مطالعات در زمینه نحوه اثرگذاری تمرینات HIIFT بر تغییرات بیان میکرو RNAها و همچنین باتوجه به جست‌وجوی موتورهای جست‌وجوگر موجود در زبان‌های فارسی و انگلیسی مطالعه‌ای که تأثیر تمرینات HIIFT را بر miR-223، miR-148a و نیم‌رخ چربی خون بررسی کرده باشد، یافت نشد لذا هدف تحقیق حاضر تغییرات miR-223، miR-148a و برخی لیپوپروتئین‌های خون متعاقب تمرینات HIIFT در زنان میانسال چاق بود.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر یک تحقیق نیمه تجربی با اندازه‌گیری پیش‌آزمون-پس‌آزمون بود که پس از کسب دریافت کد اخلاق در پژوهش (IR-KHU.KRC.1000.160) و نیز اخذ کد کارآزمایی بالینی به شماره IRCT20220816055719N1 انجام پذیرفت. جامعه آماری تحقیق حاضر متشکل از زنان دارای اضافه وزن/مبتلا به عارضه چاقی با شاخص توده بدنی بین ۲۵ تا ۳۵ کیلوگرم بر متر مربع با دامنه سنی ۳۵ تا ۴۰ سال (میان‌سال)، سالم، غیرفعال، بود. معیارهای ورود به تحقیق شامل: (۱) عدم ابتلا به بیماری‌های سوخت‌وسازی و قلبی-عروقی، ناهنجاری‌های عضلانی-اسکلتی، نداشتن هرگونه سابقه بیماری و عمل جراحی که نتایج تحقیق حاضر را دست‌خوش تغییر قرار دهد، (۲) عدم مصرف مکمل (مانند: ویتامین‌ها، ضداساینده‌ها، پروتئین، کراتین و غیره) و عدم مصرف منظم داروهای حاوی کافئین به مدت ۶ هفته قبل از شروع و حین اجرای پروتکل تحقیق، (۳) عدم شرکت منظم در تمرینات ورزشی خاص. (۴) غیرسیگاری و غیرالکلی بودن. به دنبال اخذ مجوز کمیته اخلاق در پژوهش، برای جمع‌آوری آزمودنی‌ها ابتدا با تهیه و توزیع آگهی در سطح شهر تبریز، انجمن‌ها و باشگاه‌های ورزشی و شبکه‌های اجتماعی اطلاع‌رسانی انجام شد تا افراد حائز شرایط شرکت در تحقیق شناسایی شوند. سپس در یک جلسه هماهنگی جهت شرح کامل اهداف و روش‌های اندازه‌گیری، داوطلبین تحت معاینات

¹² Body mass index (BMI)

¹³ Physical Activity Readiness Questionnaire

¹⁴ Physical Activity Readiness Medical Examination

¹⁵ Total daily energy expenditure

¹⁶ Bruce test

¹⁷ Smith

¹⁸ Second ventilatory threshold

جدول ۱- پروتکل هشت هفته‌ای تمرینات فانکشنال با شدت زیاد

تمرینات هفته اول تا دوم	تعداد	تمرینات هفته سوم تا هشتم	تعداد
گروه اول			
راه رفتن سریع	۳۰ ثانیه	دوی نرم	۳۰ ثانیه
گابلت اسکوات (اسکوات بدون دمبل)	۶ تکرار	گابلت اسکوات (اسکوات با دمبل یا کتل بل)	۶ تکرار
پرس سینه با دمبل	۸ تکرار	پرس سینه با دمبل بیشتر	۸ تکرار
پلانک	۲۰ ثانیه	پلانک + پای کوهنوردی	۱۰ ثانیه + ۱۰ عدد
گروه دوم			
راه رفتن سریع	۳۰ ثانیه	دوی نرم	۳۰ ثانیه
گام روی استپ	۶ تکرار	گام روی استپ با دمبل	۶ تکرار
روئینگ تی آر ایکس	۸ تکرار	روئینگ تی آر ایکس	۸ تکرار
شکم چرخشی روسی	۱۰ تکرار	شکم چرخشی روسی با توپ	۱۰ تکرار
(هر سمت ۵ تکرار)		مدیسن بال	(هر سمت ۵ تکرار)
گروه سوم			
راه رفتن سریع	۳۰ ثانیه	دوی نرم	۳۰ ثانیه
ددلیفت با چوب	۶ تکرار	ددلیفت با چوب	۶ تکرار
پوش پرس با دمبل	۸ تکرار	پوش پرس با دمبل بیشتر	۸ تکرار
پلانک	۲۰ ثانیه	پلانک + پای کوهنوردی	۱۰ ثانیه + ۱۰ تکرار
گروه چهارم			
راه رفتن سریع	۳۰ ثانیه	دوی نرم	۳۰ ثانیه
لانژ	۶ تکرار	لانژ	۶ تکرار
حرکت جلو بازو تی آر ایکس	۸ تکرار	حرکت جلو بازو تی آر ایکس	۸ تکرار
شکم چرخشی روسی	۱۰ تکرار	شکم چرخشی روسی با توپ	۱۰ تکرار
(هر سمت ۵ تکرار)		مدیسن بال	(هر سمت ۵ تکرار)
استراحت بین ست‌ها			
هفته اول تا سوم	۳ دقیقه	هفته چهارم	۲ دقیقه
هفته پنجم تا ششم	۲/۵ دقیقه	هفته هفتم تا هشتم	۱/۵ دقیقه

معکوس (Thermo Fisher Scientific) و حجم موردنظر از RNA را ریخته و سپس مخلوط مورد نظر را با آب دو بار تقطیر استریل به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس مخلوط فوق جهت سنتز طبق پروتکل سه مرحله‌ای در دستگاه ترموسایکلر (Analytikjena - ساخت کشور آلمان) قرار داده شد. در نهایت نمونه‌های cDNA ساخته شده تا زمان انجام Real-time PCR در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

قبل از انجام Real-time PCR یک مرحله آماده‌سازی نمونه‌ها انجام گرفت و سپس واکنش‌ها در دستگاه light cycler 96 ساخت شرکت Roche آلمان به‌همراه توالی پرایمر اختصاصی miR-148a و miR-223 انجام شد. توالی پرایمرهای اختصاصی در جدول ۲ آورده شده است. در نهایت از سطح رونوشت ژن مرجع miR-U6 برای استانداردسازی سطح بیان ژن هدف استفاده شد. در ادامه، براساس داده‌های به‌دست آمده از واکنش Real-time PCR و شناسایی میانگین Ct مربوط به ژن هدف (miR-148a و miR-223) و ژن کنترل داخلی، کمی‌سازی میزان بیان ژن نسبت به ژن مرجع (Fold change)، با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ به صورت زیر تعیین گردید [۱۵].

(ژن کنترل داخلی) Ct - (ژن مورد نظر) $\Delta Ct = Ct$

(نمونه کنترل) ΔCt - (نمونه مورد نظر) $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$

(fold change) تغییرات بیان به صورت چند برابر $2^{-\Delta\Delta Ct}$

روش‌های آماری

داده‌های جمع‌آوری شده به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد تجزیه و تحلیل شدند. به منظور بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیروویلیک استفاده شد ($p > 0.05$). همچنین به منظور بررسی اثر متغیر مستقل روی متغیرهای وابسته، آزمون تحلیل کوواریانس (ANCOVA)، آزمون تی همبسته و آزمون تعقیبی بونفرونی استفاده شد. تمامی تجزیه تحلیل‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ و در سطح معنی‌داری $p > 0.05$ انجام شدند.

HR کسب شده به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه در ۰/۹۵ ضرب شده و HR تمرین بدست آمد. لازم به ذکر است که پروتکل تمرینی به مدت هشت هفته اجرا شد (جدول ۱).

استخراج RNA

به‌منظور استخراج RNA کل از معرف Tripure isolation reagent ساخت شرکت Roche آلمان (Roche, Cat No.11667165001) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. بدین‌صورت که در طول همگن سازی یا لیز نمونه، معرف جداسازی TriPure سلول‌ها را لیز و نوکلئازها را دناتوره می‌کند، در نتیجه یکپارچگی RNA و DNA در نمونه حفظ می‌شود. پس از افزودن کلروفرم به عصاره، کل مخلوط سانتیفریوژ می‌شود. پس از سانتیفریوژ کردن، محلول شامل سه فاز است - یک فاز آبی بی رنگ (بالایی)، یک فاز میانی سفید و یک فاز آلی قرمز (پایین). فاز بالایی در یک لوله مجزا از دو فاز دیگر قرار می‌گیرد. RNA از فاز آبی بی رنگ با رسوب توسط ایزوپروپانول بازیابی می‌شود. DNA و پروتئین به طور متوالی از فاز میانی سفید و فاز آلی قرمز توسط مراحل رسوب الکلی جدا می‌شوند. در نهایت به‌منظور تعیین کیفیت و کمیت RNAهای استخراج شده، از دستگاه Nano Drop (Nano Drop ND-) ساخت شرکت Thermo Fisher Scientific ایالات متحده آمریکا استفاده شد و تا زمان سنتز cDNA در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد قرار داده شد.

سنتز cDNA و ارزیابی بیان microRNA به روش Real-time PCR

در ادامه، بعد از مشخص شدن غلظت و خلوص نمونه RNA استخراج شده در حداقل زمان ممکن به روش (STL) Stemloop و مطابق دستورالعمل کیت سنتز cDNA شرکت سازنده (TAKARA Cat No. 6130) به cDNA که دورشته‌ای و پایدارتر است تبدیل شد. بدین منظور برحسب غلظت RNA از محصول RNA برداشته و طی مراحل زیر cDNA ساخته شد: به میکروتیوب ۰/۲ مقادیر ۱ میلی لیتری DNTP، ۲ میکرولیتر بافر، ۱ میکرولیتر آغازگر STL هر یک از miRNA مورد نظر، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم ترانس کریپتاز

جدول ۲- توالی پرایمرها در آزمون Real-time PCR

طول توالی (نوکلئوتید)	(Sequence) توالی 5'→ 3' (10-50 bp)	آغازگر (ژن)
۴۹	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGTCGG_3	miR-148a معکوس
۱۹	GCTAAACAAAGTTCTGAGA	miR-148a پیشرو
۴۹	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAACCTCA_3	miR-223 معکوس
۱۹	GCTAAACCGTGTATTGAC	miR-223 پیشرو

یافته‌ها

نتایج آزمون تی همبسته نشان داد که وزن، درصد چربی، BMI، LDL، کلسترول، تری گلیسرید، miR-148a، miR-223 آزمودنی‌ها در گروه تمرینی پس از هشت هفته تمرین HIFT کاهش و مقادیر HDL آن‌ها افزایش معنی‌داری ($p > 0.05$) پیدا کرده است (جدول ۳ و ۴). همچنین مطابق آزمون تحلیل کواریانس مشاهده شد که به دنبال تمرینات هشت هفته‌ای در مقادیر وزن، مقادیر درصد چربی، BMI، LDL، HDL، کلسترول، تری گلیسرید گروه تمرینی، تفاوت معنی‌داری ($p > 0.05$) با گروه کنترل وجود دارد (جدول ۴). همچنین پس از اتمام دوره تمرینی، مقادیر miR-148a و miR-223 بین گروه‌های تمرینی و کنترل تفاوت معنی‌داری وجود داشته است ($p > 0.05$) که در جدول شماره ۴ به صورت بیان نسبی و در نمودارهای شماره ۱ و ۲ به صورت تغییرات بیان (fold change) آورده شده است.

بحث

هدف تحقیق حاضر بررسی تغییرات برخی miRNAهای مرتبط با چاقی به خصوص miR-148a و miR-223 و همچنین برخی لیپوپروتئین‌های خون متعاقب تمرینات HIFT در زنان میانسال چاق بود. این مطالعه جزو اولین تحقیقاتی است که تأثیر تمرینات HIFT را روی miRNAهای مرتبط با چاقی بررسی کرده است. نتایج حاصل از تحقیق نشان داد که گروه تمرینی کاهش معنی‌داری را در هر دو miRNA ذکر شده تجربه کردند.

کلسترول در قالب لیپوپروتئین‌های مختلف، عمدتاً LDL منتقل می‌شود. کلسترول حمل‌شده توسط LDL در خون، می‌تواند توسط گیرنده LDL (LDLR) جذب شود. LDLR که مسئول پاکسازی ۷۵ درصد از کلسترول در گردش

خون است، تقریباً در اکثر بافت‌های بدن بیان شده و بنابراین LDLها می‌توانند توسط کبد و سایر بافت‌ها، از جمله روده کوچک جذب شوند [۱۶].

miR-148a در یک ناحیه بین ژنی کروموزوم ۷ قرار دارد و عمدتاً در کبد و بافت آدیپوز بیان می‌شود. رژیم غذایی پرچرب باعث افزایش این miRNA در موش‌ها می‌شود، لذا نقش مهمی در تنظیم سوخت و ساز کلسترول دارد [۱۷، ۶]. miR-148a با کنترل مستقیم فعالیت LDLR، تنظیم‌کننده منفی بیان این گیرنده است به‌طوری که مهار miR-148a باعث افزایش بیان LDLR کبدی و کاهش سطح LDL-C پلاسما می‌شود [۱۶]. طبق برخی مطالعات به نظر می‌رسد که بیان miR-148a هم در داخل بدن و هم در شرایط آزمایشگاهی تحت کنترل رونویسی پروتئین متصل‌شونده به عنصر تنظیمی استرول ۱^۹ (SREBP1) باشد. همچنین طبق برخی مطالعات، به نظر می‌رسد که بیان LDLR mRNA در سطح رونویسی، توسط SREBP1 تنظیم می‌شود [۱۷].

انتقال معکوس کلسترول^{۲۰} (RCT) فرآیندی است که طی آن کلسترول از سلول‌های محیطی پر از چربی، مانند سلول‌های ماکروفاژ، به کبد رفته و از آنجا در بافت‌های دیگر تجمع می‌یابد یا از طریق صفرا و از راه مدفوع دفع می‌شود. یکی از مهمترین نقش‌های HDL تنظیم فرآیند RCT است [۱۶]. در گام اول بیوژنز HDL، ذرات HDL با ترکیب کلسترول و فسفولیپیدها در ذرات آپولیپوپروتئین A1 (ApoA1) فاقد چربی، در کبد و روده ساخته می‌شوند. پروتئین انتقال‌دهنده غشایی A1 وابسته به ATP (ABCA-1) یک عملکرد کلیدی را در تشکیل HDL در طی این فرآیند دارند [۱۶، ۳]. در واقع سنتز ABCA1، در کبد برای تشکیل HDL و در ماکروفاژها، برای تعدیل جریان کلسترول به HDL

¹⁹ Sterol response element-binding protein 1²⁰ Reverse cholesterol transport

جدول ۳- مشخصات فیزیولوژیکی و آنترپومتریکی آزمودنی‌ها قبل و بعد از هشت هفته تمرينات HIFT

شاخص	گروه	پیش‌آزمون میانگین $\pm$ انحراف استاندارد	پس‌آزمون میانگین $\pm$ انحراف استاندارد	درون گروهی	بین گروهی
قد (سانتی متر)	تمرین کنترل	$163/6 \pm 4/5$ $165/6 \pm 7/3$			
سن (سال)	تمرین کنترل	$40/8 \pm 6/8$ $40/9 \pm 6/5$			
وزن (کیلوگرم)	تمرین کنترل	$83/3 \pm 10/2$ $82/4 \pm 6/1$	$80 \pm 10/0$ $83/7 \pm 5/8$	$* p < 0/001$ $p = 0/057$	$\# p < 0/001$
درصد چربی (درصد)	تمرین کنترل	$37/9 \pm 3/6$ $35/5 \pm 3/9$	$34/2 \pm 3/8$ $35/7 \pm 3/9$	$* p < 0/001$ $p = 0/057$	$\# p < 0/001$
شاخص توده بدنی (کیلوگرم بر مترمربع)	تمرین کنترل	$31/1 \pm 3/6$ $30/7 \pm 2/5$	$29/9 \pm 3/5$ $31/0 \pm 2/4$	$* p < 0/001$ $p = 0/28$	$\# p < 0/001$
حداکثر اکسیژن مصرفی (میلی لیتر بر کیلوگرم بر دقیقه)	تمرین کنترل	$33/1 \pm 1/2$ $32/9 \pm 1/0$	$34/5 \pm 1/2$ $33/7 \pm 2/0$	$* p = 0/04$ $p = 0/08$	$p < 0/12$

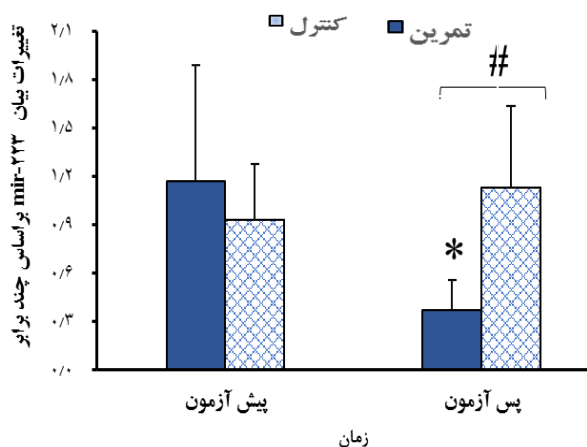
داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد نمایش داده شده است. *: تفاوت معنی دار بین پیش‌آزمون و پس‌آزمون (آزمون تی همبسته) $\#$: تفاوت بین گروهی (آزمون تحلیل کوواریانس).

جدول ۴- مقایسه میانگین مقادیر miR-223 و miR-148a و نیمرخ چربی سرمی قبل و بعد از هشت هفته تمرينات HIFT.

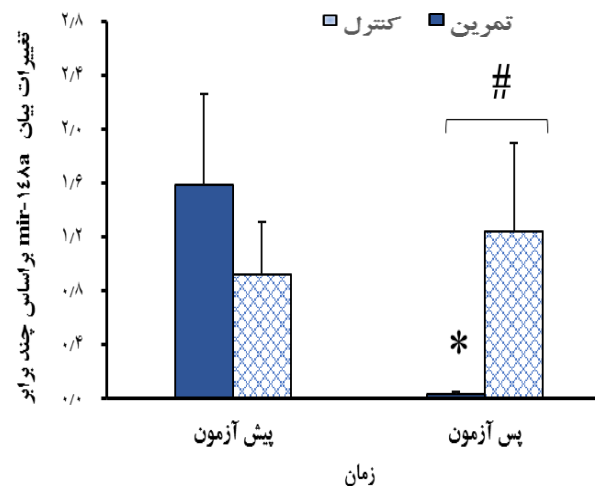
شاخص	گروه	پیش‌آزمون میانگین $\pm$ انحراف استاندارد	پس‌آزمون میانگین $\pm$ انحراف استاندارد	درون گروهی	بین گروهی
miR-223 (بیان نسبی)	تمرین کنترل	$2/1 \pm 1/3$ $2/0 \pm 0/8$	$0/7 \pm 0/3$ $2/0 \pm 1/1$	$* p = 0/009$ $p = 0/09$	$\# p < 0/006$
miR-148a (بیان نسبی)	تمرین کنترل	$2/4 \pm 0/9$ $1/7 \pm 0/7$	$0/4 \pm 0/2$ $1/9 \pm 1/3$	$* p < 0/001$ $p = 0/571$	$\# p < 0/001$
تری گلیسرید (میلی گرم بر دسی لیتر)	تمرین کنترل	$197/5 \pm 19/9$ $179/8 \pm 38/2$	$136/7 \pm 27/1$ $187/7 \pm 41/4$	$* p < 0/001$ $p = 0/555$	$\# p < 0/02$
HDL-C (میلی گرم بر دسی لیتر)	تمرین کنترل	$38/1 \pm 4/7$ $36/5 \pm 3/2$	$49/1 \pm 9/4$ $35/4 \pm 3/1$	$* p = 0/041$ $p = 0/055$	$\# p < 0/001$
LDL-C (میلی گرم بر دسی لیتر)	تمرین کنترل	$116/1 \pm 35/6$ $158/4 \pm 42/6$	$86/0 \pm 20/5$ $157/8 \pm 42/4$	$* p = 0/015$ $p = 0/76$	$\# p < 0/001$
کلسترول (میلی گرم بر دسی لیتر)	تمرین کنترل	$199 \pm 33/2$ $229/2 \pm 44/4$	$162/5 \pm 17/9$ $230/8 \pm 43/6$	$* p = 0/007$ $p = 0/224$	$\# p < 0/001$

داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد نمایش داده شده است. *: تفاوت معنی دار بین پیش‌آزمون و پس‌آزمون (آزمون تی همبسته) $\#$: تفاوت بین گروهی (آزمون تحلیل کوواریانس).

چندین گیرنده لیپوپروتئینی مختلف وجود دارد که هر کدام ویژگی‌های لیگاند و مکانیسم‌های منحصر به فردی را برای رساندن کلسترول به سلول‌ها دارند [۱۷]. یکی از این گیرنده‌ها ریسپتور اسکاونجر B1 (SR-B1) است. HDL-C، عضوی از خانواده CD36 است که در متابولیسم HDL-C، پاکسازی کلسترول و انتقال آن نقش دارد [۶]. SR-B1 به‌طور مثبت انتقال معکوس کلسترول را با افزایش پاکسازی کلسترول به مدفوع تنظیم می‌کند [۶، ۱۶]. طبق چندین مطالعه miR-223 که مستقیماً به 3'-UTR SR-B1 متصل می‌شوند و بیان آن را مهار می‌کنند و نشان داده شده مهار این miRNA باعث افزایش پاکسازی HDL-C می‌شود [۵، ۶]. در مطالعه حاضر، نیز مقادیر miR-223 در اثر تمرینات HIFT کاهش یافت و لذا می‌توان جنبیت استنباط کرد که با کاهش مقادیر این miRNA اثر مهاري آن بر SR-B1 از بین رفته و باعث افزایش پاکسازی کلسترول شده است. این نتایج با نتایج ثابت^{۲۴} و همکاران (۲۰۱۶) هم سو است که گزارش کردند کاهش وزن ناشی از رژیم غذایی با پروتئین بالا می‌تواند سطح miR-223 را در مردان چاق کاهش دهد [۱۸]. با توجه به کاهش وزن آزمودنی‌ها در مطالعه حاضر، یکی از عوامل کاهش این miRNA را می‌توان به کاهش وزن آزمودنی‌ها نسبت داد. با این حال با توجه به مطالعات بسیار کم انجام‌شده در این زمینه، به مطالعات بیشتری نیاز است.



نمودار ۲- تغییرات بیان miR-223 به صورت «چند برابر» (Fold change). *: بیانگر تغییرات دو مرحله پیش‌آزمون و پس‌آزمون در گروه تمرین می‌باشد (تغییر درون گروهی) و همچنین #: نشانگر تفاوت بین دو گروه تمرین و کنترل در مرحله پس‌آزمون می‌باشد (تغییر بین گروهی).



نمودار ۱- تغییرات بیان miR-148a به صورت «چند برابر» (Fold change). *: بیانگر تغییرات دو مرحله پیش‌آزمون و پس‌آزمون در گروه تمرین می‌باشد (تغییر درون گروهی) و همچنین #: نشانگر تفاوت بین دو گروه تمرین و کنترل در مرحله پس‌آزمون می‌باشد (تغییر بین گروهی).

HDL ضروری هستند [۱۶]. گزارش شده است که مهار miR-148a بیان ABCA1 کبدی و سطح HDL-C در گردش را افزایش داده و باعث بهبود نسبت LDL-C/HDL-C می‌شود [۳، ۶].

علاوه بر LDLR و ABCA1، miR-148a به‌طور مستقیم 3'-UTR سایر ژن‌های دخیل در سوخت‌وساز چربی، از جمله PGC1- α ، AMPK و ژن القاشده با انسولین^{۲۱} (INSIG-1) را هدف قرار می‌دهد [۱۷]. هرچند در مطالعه حاضر این مقادیر سنجیده نشد، با این حال تمرینات ورزشی باعث کاهش مقادیر miR-148a شد که حداقل بخشی از کاهش مقادیر LDL-C و افزایش HDL-C را می‌توان به وسیله سازوکارهای اشاره شده توجیه کرد. این نتایج با نتایج تحقیق باتارای^{۲۲} و همکاران (۲۰۲۱) هم سو است که بیان داشتند مهار miR-148a با تنظیم افزایشی LDLR و ABCA1 همراه است [۶]. همچنین سو^{۲۳} و همکاران (۲۰۲۱) در مقاله مروری اشاره کردند که افزایش بیان miR-148a با کاهش LDLR و در نتیجه افزایش LDL-C همراه است [۵] که با نتایج تحقیق حاضر نیز هم سو است، با این حال به تحقیقات بیشتری در این زمینه نیاز است.

²¹ Insulin induced gene-1

²² Bhattarai

²³ Su

²⁴ Tabet

نتیجه گیری

به نظر می‌رسد که تمرینات HIFT می‌تواند با کاهش میزان چربی و همچنین کاهش برخی miRNAهای مرتبط با چاقی و به خصوص miR-223، miR-148a، باعث بهبود نیم‌رخ‌های چربی خون شده و از این طریق با جلوگیری از بیماری‌های ناشی از دیس لیپیدی مثل دیابت نوع ۲، بیماری قلبی عروقی و غیره باعث بهبود سلامتی شود. لذا به نظر می‌رسد که تجویز HIFT می‌تواند یک روش مناسبی برای کنترل دیس لیپیدی باشد.

سپاسگزاری

این تحقیق مستخرج از یک طرح پژوهشی در دانشگاه فنی حرفه‌ای استان آذربایجان شرقی به شماره ۵۴/۱۵۶۷ می‌باشد. بدین وسیله از تمامی کسانی که در انجام این طرح ما را یاری کردند تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

ا.ش.: نگارش مقاله و طراحی طرح تحقیق؛ ح.ز.: نگارش مقاله، کارهای آزمایشگاهی و طراحی طرح تحقیق؛ ژ.پ.: انجام کارهای آماری و طراحی پروتکل تمرینی؛ ل.م.: کارهای میدانی و اجرای میدانی پروتکل تمرینی.

فهرست منابع

1. Vekic J, Zeljkovic A, Stefanovic A, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V, Obesity and dyslipidemia. *Metabolism* 92 (2019) 71-81.
2. Pirillo A, Casula M, Olmastroni E, Norata GD, Catapano AL, Global epidemiology of dyslipidaemias. *Nat Rev Cardiol* 10 (2021) 689-700.
3. Agbu P, Carthew RW, MicroRNA-mediated regulation of glucose and lipid metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (2021) 425-38.
4. Ji C, Guo X, The clinical potential of circulating microRNAs in obesity. *Nat Rev Endocrinol* 12 (2019) 731-43.
5. Fernández-Tussy P, Ruz-Maldonado I, Fernández-Hernando C, MicroRNAs and circular RNAs in lipoprotein metabolism, *Curr Atheroscler Rep* 7 (2021) 33.
6. Bhattarai A, Likos EM, Weyman CM, Shukla GC, Regulation of cholesterol biosynthesis and lipid metabolism: A microRNA management perspective. *Steroids* 173 (2021) 108878.

سه تعدیل‌کننده عمده اپی ژنتیکی تنظیم بیان ژن‌ها وجود دارد که شامل متیلاسیون DNA، تغییرات هیستونی و فعالیت miRNA هستند [۱۹]. طبق برخی مطالعات، سه عامل باهم در تعامل بوده و به خصوص متیلاسیون DNA تنظیم‌کننده‌ی مهم بیان miRNAs است [۲۰، ۲۱]. یکی از سازوکارهای احتمالی تأثیرگذاری تمرینات HIFT، متابولیت‌های تولیدشده در آن مانند استیلر-CoA (برای استیلاسیون هیستون) و اس-آدنوزیل-ال متیونین (برای متیلاسیون) است که برای تعدیلات اپی ژنتیکی بافت سفید چربی ضروری است [۲۱]. لاکتات نیز می‌تواند هم در بافت عضلانی و هم در سایر بافت‌های مثل بافت آدیپوز و کبد متیلاسیون DNA و بیان miRNA تغییر دهد [۱۹، ۲۱]. بدین وسیله می‌توان بخشی از تغییرات miR-223 و miR-148a و اثرات ناشی از تغییرات آن‌ها روی نیم‌رخ‌های چربی خون را توجیه کرد. این نتایج با نتایج تیم تحقیقاتی دونگویی^{۲۵} و همکاران (۲۰۱۹) هم‌سو است که به بررسی بیان mir-126 و نیم رخ لیپیدی خون پرداختند و گزارش کردند که تمرینات ورزشی باعث بهبود بیان mir-126 و کاهش میزان نیم رخ لیپیدی خون می‌شود [۲۲]. در مطالعه دیگری دیماسی^{۲۶} و همکاران (۲۰۱۸) نیز گزارش کردند که تمرینات HIIT بیان برخی miRNAهای مرتبط با چاقی را در زنان چاق تغییر می‌دهد [۲۳] که این مطالعه نیز با نتایج تحقیق ما هم‌سو است. در مجموع با توجه به مطالعات محدود در رابطه با تأثیرات تمرینات HIFT و miRNA، این نتایج باید با احتیاط تفسیر شوند و مطالعات بیشتری را در این حیطه می‌طلبد.

7. Su X, Nie M, Zhang G, Wang B, MicroRNA in cardio-metabolic disorders. *Clin Chim Acta* 518 (2021) 134-141.
8. Andreato LV, High-intensity interval training: methodological considerations for interpreting results and conducting research. *Trends Endocrinol Metab* 11 (2020) 81-87.
9. De Oliveira F, Paz GA, Corrêa Neto VG, Alvarenga R, Marques Neto SR, Willardson JM, Miranda H, Effects of different recovery modalities on delayed onset muscle soreness, recovery perceptions, and performance following a bout of high-intensity functional training. *Int J Environ Res Public Health* 4 (2023) 3461.

²⁵ Donghui

²⁶ Dimassi

10. Feito Y, Heinrich KM, Butcher SJ, Poston WSC, High-intensity functional training (HIFT): Definition and research implications for improved fitness. *Sports* 3 (2018) 76.
11. Zolfi HR, Shakib A, Valipour A, Effect of eight weeks of high-intensity interval training on miR-204, serum glucose, and lipid profile in men with prediabetes. *Yafteh* 2 (2022) 91-105 [in Persian].
12. Kouhgardzadeh S, Valipour-Dehnou V, Molanouri-Shamsi D, Effect of high-intensity functional training on serum levels of ApoA-I, ApoB and lipid profile in elderly men and women. *FEYZ* 2 (2022) 138-146 [in Persian].
13. Gibson AL, Wagner DR, Heyward VH, Advanced fitness assessment and exercise prescription, 8E. Human Kinetics, 2019.
14. Smith LE, Van Guilder GP, Dalleck LC, Harris NK, The effects of high-intensity functional training on cardiometabolic risk factors and exercise enjoyment in men and women with metabolic syndrome: study protocol for a randomized, 12-week, dose-response trial. *Trials* 1 (2022) 182.
15. Pfaffl MW, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 9 (2001) e45.
16. Luo J, Yang H, Song BL, Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nat. Rev Mol Cell Biol* 4 (2020) 225-245.
17. Singh AK, Aryal B, Zhang X, Fan Y, Price NL, Suárez Y, Fernández-Hernando C, Posttranscriptional regulation of lipid metabolism by non-coding RNAs and RNA binding proteins. *Semin Cell Dev Biol* 1(2018) 129-140.
18. Tabet F, Cuesta Torres LF, Ong KL, Shrestha S, Choteau SA, Barter PJ, Clifton P, Rye KA, High-density lipoprotein-associated miR-223 is altered after diet-induced weight loss in overweight and obese males. *PLoS One* 3 (2016) e0151061.
19. Cruciani S, Delitala AP, Cossu ML, Ventura C, Maioli M, Management of obesity and obesity-related disorders: From stem cells and epigenetics to its treatment. *Int J Mol Sci* 3 (2023) 2310.
20. Garcia LA, Zapata-Bustos R, Day SE, Campos B, Hamzaoui Y, Wu L, Leon AD, Krentzel J, Coletta RL, De Filippis E, Roust LR, Mandarino LJ, Coletta DK, Can exercise training alter human skeletal muscle DNA methylation?. *Metabolites* 3 (2022) 222.
21. Barrón-Cabrera E, Ramos-Lopez O, González-Becerra K, Riezu-Boj JI, Milagro FI, Martínez-López E, Martínez JA, Epigenetic modifications as outcomes of exercise interventions related to specific metabolic alterations: a systematic review. *Lifestyle Genom* 1-6 (2019) 25-44.
22. Donghui T, Shuang B, Xulong L, Meng Y, Yujing G, Yujie H, Juan L, Dongsheng Y, Improvement of microvascular endothelial dysfunction induced by exercise and diet is associated with microRNA-126 in obese adolescents. *Microvasc Res* 123 (2019) 86-91.
23. Dimassi S, Karkeni E, Laurant P, Tabka Z, Landrier JF, Riva C, Microparticle miRNAs as biomarkers of vascular function and inflammation response to aerobic exercise in obesity? *Obesity* 10 (2018) 1584-1593.

Research paper

Alterations of miR-148a, miR-223, and some blood lipoproteins following high-intensity functional training in overweight or obese middle-aged women

Amir shakib¹, Hamid Reza Zolfi², Zhaleh Pashei¹, Leila Moradi¹

1. Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

2. Department of Physical Education and Sport Science, Technical and Vocational University (TVU), Tehran, Iran

Received: 27 July 2023

Accepted: 5 August 2023

Abstract

Background and aim: MicroRNAs (miRNA) are single-stranded non-coding RNAs containing 19-22 nucleotides. Research investigating the molecular processes underlying obesity-induced dyslipidemia has revealed that miRNA plays a conflicting role in this scenario. As there is a need for more research in this area, this study aimed to investigate how high-intensity functional training (HIFT) affects miR-148a, miR-223, and blood lipoproteins in overweight or obese middle-aged women..

Methods: Twenty middle-aged women between 35-40 years old and overweight or obese (BMI=25-30 kg/m²) were randomly assigned to two groups based on their fat percentage and aerobic capacity ($\dot{V}O_2\text{max}$). The first group underwent HIFT exercises, while the second group served as a control. Blood samples were taken from the participants 48 hours before and after eight weeks of HIFT exercises to analyze miR-148a, miR-223, and blood lipid profiles. The data was then analyzed using analysis of covariance (ANCOVA), paired t-test, and Bonferroni post hoc tests.

Results: After eight weeks of the HIFT training program, the training group showed a significant decrease miR-148a ($p = 0.001$), miR-223 ($p = 0.006$), LDL-C ($p < 0.001$), triglyceride ($p = 0.002$), and cholesterol ($p < 0.001$) compared to the control group. Additionally, the concentration of HDL-C ($p = 0.001$) increased in the training group compared to the control group.

Conclusion: It seems that HIFT training can improve blood lipid profiles by affecting some obesity-related miRNAs, especially miR-148a miR-223, and improve health thereby preventing diseases caused by dyslipidemia such as type 2 diabetes, and cardiovascular disease.

Keywords: HIFT training, obesity, miR-148a, miR-223, lipoprotein

Please cite this article as follows:

Shakib A, Zolfi HR, Pashei Z, Moradi L, Alteration of miR-148a, miR-223, and some blood lipoproteins following high-intensity functional training in overweight or obese middle-aged women. *Iran J Physiol Pharmacol* 7 (2023) 46-56.

*Corresponding authors: hzolfi@tvu.ac.ir, Hamidreza.zolfi@yahoo.com (ORCID: 0000-0002-7905-2588)